



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

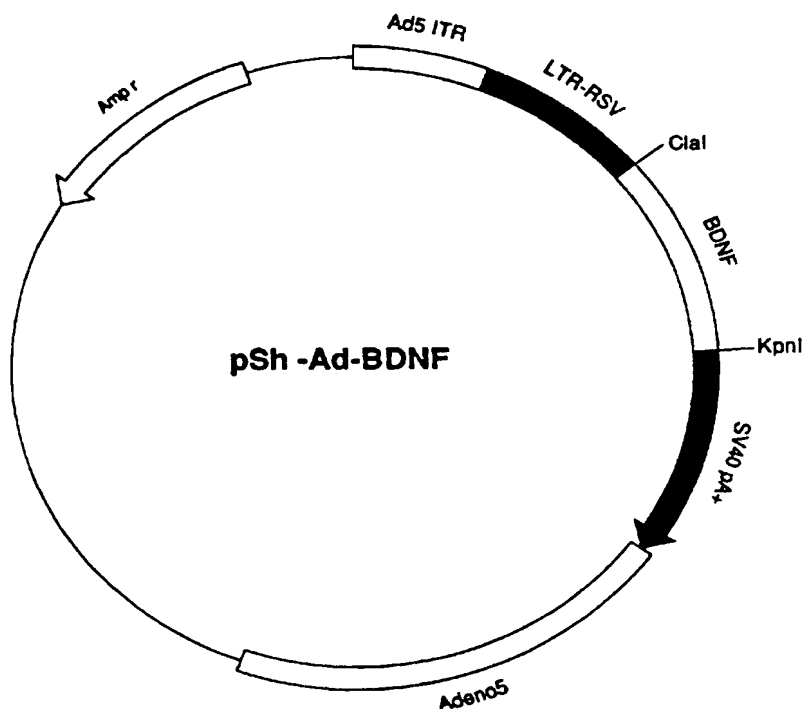
(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 15/12, C07K 14/475, C12N 7/01, 5/10, A61K 39/235	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/25804 (43) Date de publication internationale: 28 septembre 1995 (28.09.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00250 (22) Date de dépôt international: 2 mars 1995 (02.03.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/03191 18 mars 1994 (18.03.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BARNEOUD, Pascal [FR/FR]; 1, avenue Anatole-France, F-94600 Choisy-le-Roi (FR). DELAERE, Pia [BE/FR]; 108 bis, boulevard Auguste-Blanqui, F-75013 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). PRADIER, Laurent [FR/FR]; 5 bis, rue d'Alésia, F-75014 Paris (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-Le Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRUSES CODING FOR BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF)**(54) Titre:** ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LE FACTEUR NEUROTROPHIQUE DERIVE DU CERVEAU (BDNF)**(57) Abstract**

Recombinant adenoviruses comprising a heterologous DNA sequence coding for brain-derived neurotrophic factor (BDNF), preparation thereof, and use thereof for treating and/or preventing degenerative neurological diseases.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN hétérologue codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), leur préparation, et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LE FACTEUR NEUROTROPHIQUE DERIVE DU CERVEAU (BDNF)

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

5 Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, "brain-derived neurotrophic factor"). L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation thérapeutique, notamment en thérapie génique.

10 Les maladies neurodégénératives représentent une large part des dépenses de santé dans les pays occidentaux, part qui ne cesse de s'accroître suite au vieillissement de la population. Au titre de ces affections, on peut citer notamment la maladie d'Alzheimer, le maladie de Parkinson, la chorée de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, etc. Les signes pathologiques et l'étiologie de ces maladies sont fort
15 variés, mais toutes ces maladies résultent d'une perte progressive de cellules neuronales dans le système nerveux central, parfois au sein de structure très localisées comme la substance noire dans la maladie de Parkinson. Bien que certains traitements pharmacologiques palliatifs soient déjà disponibles, leurs effets sont relativement limités. La présente invention décrit une approche thérapeutique nouvelle,
20 particulièrement avantageuse pour le traitement de ces maladies. Plus particulièrement, la présente invention décrit des vecteurs permettant de promouvoir directement la survie des cellules neuronales impliquées dans ces pathologies, par expression efficace et localisée de certains facteurs trophiques.

Les facteurs trophiques sont une classe de molécules ayant des propriétés de
25 stimulation de la croissance neuritique ou de la survie des cellules nerveuses. Le premier facteur possédant des propriétés neurotrophiques, le NGF ("Nerve Growth Factor"), a été caractérisé il y a une quarantaine d'années (pour revue, voir Levi-Montalcini et Angelletti, *Physiol. Rev.* 48 (1968) 534). Ce n'est que récemment que d'autres facteurs neurotrophiques ont été identifiés, et notamment le facteur
30 neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Thoenen, *Trends in NeuroSci.* 14 (1991) 165). Le BDNF est une protéine de 118 acides aminés et de poids moléculaire 13,5 kD. In vitro, le BDNF stimule la formation de neurites et la survie en culture des neurones ganglionnaires de la rétine, des motoneurones de la moelle épinière, des

neurones cholinergiques du septum ainsi que des neurones dopaminergiques du mésencéphale (revue par Lindsay in Neurotrophic Factors, Ed, (1993) 257, Academic Press). Toutefois, bien que ses propriétés soient intéressantes, l'application thérapeutique du BDNF se heurte à différents obstacles. En particulier, l'absence de
5 biodisponibilité du BDNF limite toute utilisation thérapeutique. Par ailleurs, il n'existe pas de moyens efficaces permettant de délivrer le BDNF de manière durable et localisée à certaines régions désirées de l'organisme. Enfin, il est essentiel que le BDNF délivré soit actif et puisse exercer une activité thérapeutique in vivo.

10 La présente invention apporte une solution particulièrement avantageuse à ces problèmes. La présente invention réside en effet dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives de BDNF. Dans la demande copendante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés pour le
15 transfert de gènes in vivo dans le système nerveux. La présente invention concerne des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour le transfert d'un gène spécifique dans le système nerveux. Plus particulièrement, la présente invention concerne un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), sa préparation, et son utilisation
20 pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BDNF, d'administrer ces adénovirus recombinants in vivo, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de BDNF in vivo,
25 et en particulier dans le système nerveux, et sans effet cytopathologique. Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus défectif, délété de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour le BDNF (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés du BDNF.
30 La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression du BDNF in vivo. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention des maladies
35 neurodégénératives.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou un dérivé de celui-ci.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel adénovirus recombinant défectif pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le BDNF humain ou un BDNF animal. La séquence d'ADN codant pour le BDNF humain et pour le BDNF de rat a été clonée et séquencée (Maisonpierre et al., Genomics 10 (1991) 558), ainsi que notamment la séquence codant pour le BDNF de porc (Leibrock et al., Nature 341 (1989) 149). Préalablement à leur incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, ces séquences sont avantageusement modifiées, par exemple par mutagenèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes (voir exemple 1.2.). Dans le cadre de la présente invention, on préfère utiliser une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF). Par ailleurs, comme indiqué ci-avant, il est également possible d'utiliser une construction codant pour un dérivé du BDNF, en particulier un dérivé du BDNF humain. Un tel dérivé comprend par exemple toute séquence obtenue par mutation, délétion et/ou addition par rapport à la séquence native, et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques du BDNF (effet trophique et/ou différenciateur). Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après et exemple 2). L'activité biologique des dérivés ainsi obtenus peut ensuite être aisément déterminée, comme indiqué notamment dans l'exemple 3.. Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée in vivo, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules

ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction. De manière particulièrement avantageuse, la séquence de la présente invention code pour le BDNF précédé de la région pro native (proBDNF).

Par ailleurs, il est particulièrement important pour une meilleure mise en oeuvre de la présente invention que la séquence utilisée contienne également un signal de sécrétion permettant de diriger le BDNF synthétisé dans les voies de sécrétion des cellules infectées, de manière à ce que le BDNF synthétisé soit libéré dans les compartiments extracellulaires et puisse activer ses récepteurs. Le signal de sécrétion est avantageusement le propre signal du BDNF. Mais il peut également s'agir d'un signal de sécrétion hétérologue ou même artificiel.

La séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Il est à noter que dans la séquence génomique codant pour le BDNF, les introns sont localisés dans les régions non codantes. De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg. En particulier, l'utilisation d'un ADNg peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, l'adénovirus comprend donc une séquence d'ADNc codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'adénovirus comprend une séquence d'ADNg codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Avantagusement, la séquence d'ADN code pour le proBDNF et, de préférence, le préproBDNF.

Avantageusement, la séquence codant pour le BDNF est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du BDNF. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules nerveuses, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule nerveuse. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs de l'énolase neurone-spécifique, de la GFAP, etc.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

La demanderesse a en effet montré que le promoteur LTR du virus du sarcome de rous (RSV) permettait une expression durable et importante du BDNF dans les cellules du système nerveux, notamment central.

Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux. Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour le facteur

neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

5 Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-
10 fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour le BDNF.

Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus
15 préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la
20 présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De
25 préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

30 Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour le BDNF. La recombinaison homologue se
35 produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire

appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus déficient, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Comme indiqué ci-avant, la présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), de la maladie d'Huntington, de l'épilepsie et de la démence vasculaire.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique. L'emploi d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire du BDNF. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre

de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central,

ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être
5 contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou
10 la prévention des maladies neurodégénératives. Elle est tout particulièrement adaptée au traitement des maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS. Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules nerveuses, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale.
15 De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection, ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

20 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pXL2244

Figure 2 : Représentation du vecteur pSh-Ad-BDNF

25 Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au
30 phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory,

Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

- 5 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

- 10 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

- 15 La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

- L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

- 20 La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Construction du vecteur pSh-Ad-BDNF.

- Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le BDNF sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).

30 1.1. Vecteur de départ (pXL2244) : Le plasmide pXL2244 contient l'ADNc de l'ApoAI sous le contrôle du promoteur LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 (figure 1). Il a été construit par insertion d'un fragment ClaI-EcoRV

contenant l'ADNc codant pour la préproApoA1 dans le vecteur pLTR RSV- β gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), digéré par les mêmes enzymes.

1.2. Clonage d'un ADNc codant pour le prepro-BDNF. L'ADNc complet
5 codant pour le prepro-BDNF de rat (790 pb) a été cloné à partir d'une banque d'ADN génomique de rat par la technique de PCR, en utilisant comme amorce les oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 5' : 5'-TTCATCGAATTCCACCAGGTGAGAAG-3' (SEQ ID n°1)

Oligonucléotide 3' : 5'-AATATAATCTAGACAACATAAATCC-3' (SEQ ID n°2)

10 La région 5' de la séquence obtenue a ensuite été modifiée par insertion d'un site de restriction ClaI, 25 bases en amont de l'ATG. Ce site a été introduit par PCR au moyen des oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 5' : 5'-TAGCTTTCATCGATTTCACCAG-3' (SEQ ID n°3)

Oligonucléotide 3' : 5'-AATATAATCTAGACAACATAAATCC-3' (SEQ ID n°4)

15 La séquence ainsi obtenue a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pCRII-BDNF.

1.3. Construction du vecteur pSh-Ad-BDNF

20 Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-BDNF contenant la séquence codant pour le prepro-BDNF sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

Le vecteur pCRII-BDNF a été digéré par les enzymes ClaI et KpnI, et le fragment de 0,85 kb résultant, contenant la séquence codant pour le prépro-BDNF a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low Melting
25 Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 a été digéré par les mêmes enzymes de restriction ClaI et KpnI, puis précipité après inactivation de ces dernières. Le vecteur linéaire résultant, préalablement isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose, et le fragment de 0,85 kb ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-BDNF (figure 2).

30 Exemple 2 : Construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

Cet exemple décrit la construction d'un second vecteur comprenant une séquence d'ADN de fusion codant pour le BDNF sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).

2.1. Génération de l'ADN de fusion : Dans cet exemple, une forme alternative de la séquence d'ADN codant pour le prépro-BDNF a été construite. Cette forme a été obtenue par insertion, à l'extrémité 3' terminale de la séquence décrite dans l'exemple 1.2., d'une séquence codant pour un épitope de sept acides aminés (tag) reconnu par un anticorps disponible commercialement (IBI, Integra Biosciences, Eaubonne, France). La séquence de la région ainsi fusionnée est la suivante (SEQ ID n°5) :

```

Arg Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp ***
10 AGA GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC TAG
-----

```

```

C-ter          Seq. fusionnée
BDNF

```

15 La séquence ainsi obtenue a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pCRII-BDNFtag.

2.2. Construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag

Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag contenant la séquence de fusion codant pour le prépro-BDNF sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

Le vecteur pCRII-BDNFtag a été digéré par les enzymes ClaI et KpnI, et le fragment de 0,87 kb résultant, contenant la séquence codant pour le prépro-BDNFtag a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low Melting Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 (exemple 1.1.) a été digéré par les mêmes enzymes de restriction ClaI et KpnI, puis précipité après inactivation de ces dernières. Le vecteur linéaire résultant, préalablement isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose, et le fragment de 0,87 kb ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

30 Exemple 3. Fonctionnalité des vecteurs pSh-Ad-BDNF et pSh-Ad-BDNFtag

La capacité des vecteurs pSh-Ad-BDNF et pSh-Ad-BDNFtag à exprimer sur culture cellulaire une forme biologiquement active du BDNF a été démontrée par transfection transitoire de cellules COS1. Pour cela, les cellules ($2 \cdot 10^6$ cellules par

boite de 10 cm de diamètre) ont été transfectées (8 µg de vecteur) en présence de Transfectam. Après 48 heures, le surnageant de culture des cellules a été récolté. Des dilutions sérielles (1/200 et 1/50) de ce surnageant ont ensuite été ajoutées à des cultures primaires de neurones du septum (Hefti et al. In Dissection and Tissue
5 cultures : Manual of the Nervous System (1989) 172, Alan R. Liss, Inc). L'effet trophique (survie cellulaire et pousse neuritique) sur ces cultures a été observé après coloration, et l'effet différentiateur par dosage de l'expression de l'enzyme choline acétyl transférase (ChAT), selon la technique décrite par Fonnum (J. Neurochem. 24 (1975) 407).

10 Exemple 4. Construction des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BDNF

4.1. Construction de l'adénovirus Ad-BDNF

Le vecteur pSh-Ad-BDNF a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les
15 fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-BDNF a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pSh-Ad-BDNF, selon le protocole suivant : le plasmide pSh-Ad-BDNF et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-
20 transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre
25 d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-BDNF peut être conservé à -80°C dans 20
30 % de glycérol.

4.2. Construction de l'adénovirus Ad-BDNFtag

L'adénovirus Ad-BDNFtag a été construit selon le même protocole que l'adénovirus Ad-BDNF, mais en utilisant comme vecteur de départ le vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

Exemple 5. Fonctionnalité de l'adénovirus Ad-BDNF

5 La capacité de l'adénovirus Ad-BDNF à infecter des cellules en culture et à exprimer dans le milieu de culture une forme biologiquement active du BDNF a été démontrée par infection des lignées 293 humaine et PC12 de rat. La présence de BDNF actif dans le surnageant de culture a ensuite été déterminée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 3.

10 Ces études permettent de montrer que l'adénovirus exprime bien une forme biologiquement active du BDNF en culture cellulaire.

Exemple 6 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion du fimbria-fornix

15 Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion du fimbria-fornix, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

20 Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie septo-hippocampique (fimbria-fornix) a été sectionnée au niveau de l'hémisphère gauche. Cette lésion mécanique a été réalisée à l'aide d'un couteau chirurgical rétractable. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées à cet effet sont, par rapport au bregma : AP : -1,7; ML : +1,5; V : -5,5 à -0,5.

25 L'adénovirus recombinant BDNF a été injecté immédiatement après la lésion, dans le noyau médian du septum et dans la partie dorsale de l'hippocampe déafférenté (hippocampe du côté de la lésion). Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

30 Les injections sont réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les

volumes d'injection dans l'hippocampe et le septum sont respectivement 3 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

5 Pour l'injection dans l'hippocampe, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-4; ML=3,5; V=-3,1 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au niveau du bregma.

10 Pour l'injection dans le septum, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=1; ML=1; V=-6 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au niveau du bregma. Dans cette condition, la canule présente un angle de 9 degrés par rapport à la verticale (dans le sens médio-latéral) afin d'éviter le sinus veineux médian.

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention ont été mis en évidence par trois types d'analyse : une analyse histologique et immunohistochimique, une analyse quantitative et une analyse comportementale.

15 Analyse histologique et immunohistochimique

La lésion mécanique du fimbria-fornix induit une perte de neurones cholinergiques (révélée en immunohistologie par un anticorps anti-choline acétyl transférase, ChAT) dans le septum médian, ainsi que la dénervation cholinergique dans l'hippocampe (détectée en histochimie par l'activité de l'acétyl choline estérase, AChE).

5 L'analyse histologique des cerveaux injectés est réalisée 3 semaines après l'injection intracérébrale de l'adénovirus Ad-BDNF. Pour cela, les animaux sont sacrifiés, sous anesthésie, par perfusion intracardiaque de 4% paraformaldéhyde. Après prélèvement, post-fixation et cryoprotection, le cerveau est coupé au cryomat selon le plan coronal : des coupes sériées coronales de 30 µm d'épaisseur sont réalisées sur
10 toute la longueur du septum médian et aux niveaux antérieur, médian et postérieur de l'hippocampe. Pour le septum médian, des coupes espacées de 180 µm (1 coupe sur 6) sont colorées au crésyl violet (pour évaluer la densité neuronale) et immunomarquées par un anticorps anti ChAT (Biochem) (pour identifier les neurones cholinergiques). La méthode immunohistochimique est celle de la streptavidine-biotine peroxydase
15 révélée par la DAB. Pour l'hippocampe, des coupes espacées de 180 µm sont colorées selon la méthode histochimique pour l'AChE (acétyl choline estérase) afin de détecter l'innervation cholinergique. Les coupes sont montées sur lames de verre.

Analyse quantitative

20 Le nombre de neurones cholinergiques (ChAT positifs) dans le septum médian est le paramètre d'évaluation des effets de l'adénovirus Ad-BDNF. Le dénombrement est réalisé sur un échantillon (1 coupe sur 6 sur toute la longueur du septum médian). Pour chaque coupe, les neurones ChAT positifs sont dénombrés séparément des 2 cotés du septum. Les résultats cumulés pour toutes les coupes sont exprimés par le rapport du nombre de neurones ChAT positifs du côté lésé sur le
25 nombre de neurones ChAT positifs du côté non lésé.

Analyse comportementale

Il est connu qu'une lésion bilatérale de la voie septo-hippocampique conduit à des déficits mnésiques. Afin d'évaluer les effets fonctionnels protecteurs d'une injection d'adénovirus Ad-BDNF sur ce type de lésion, les performances mnésiques des animaux
30 sont analysées au cours de 2 tests comportementaux : le test de la piscine de Morris (mémoire de référence visuo-spatiale) et le test TMTT ("two-trials memory task"; "mémoire à court-terme d'un environnement nouveau").

Exemple 7 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion de la voie nigro-striée

Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion de la voie nigro-striée, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie nigro-striée a été lésée au niveau du faisceau mésencéphalique médian (MFB) par injection de la toxine 6-hydroxy dopamine (6OH-DA). Cette lésion chimique par injection a été unilatérale, suivant les coordonnées stéréotaxiques suivantes : AP : 0 et -1; ML : +1,6; V : -8,6 et -9 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère). La barre d'incisive est fixée au niveau +5 mm.

L'adénovirus recombinant BDNF a été injecté immédiatement après la lésion, dans la substance noire et le striatum, du côté de la lésion. Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

Les injections ont été réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans le striatum et la substance noire sont respectivement 2x3 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

Pour l'injection dans la substance noire, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-5,8; ML=+2; V=-7,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère).

Pour les injections dans le striatum, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=+0,5 et -0,5; ML=3; V=-5,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère).

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention ont été mis en évidence par trois types d'analyse : une analyse histologique et immunohistochimique, une analyse quantitative et une analyse comportementale.

Analyse histologique et immunohistochimique

La lésion chimique de la voie nigro-striée induit une perte neuronale dans la substance noire ainsi que la dénervation dopaminergique dans le striatum (révélées en immunohistologie par un anticorps anti-tyrosine hydroxylase, TH).

- 5 L'analyse histologique des cerveaux injectés est réalisée 3 semaines après l'injection intracérébrale de l'adénovirus Ad-BDNF dans les conditions décrites dans l'exemple 6. Les coupes sériées coronales de 30 µm d'épaisseur sont réalisées dans la substance noire et le striatum. Des coupes espacées de 180 µm (1 coupe sur 6) sont colorées au crésyl violet (pour évaluer la densité neuronale) et immunomarquées par
10 un anticorps anti tyrosine hydroxylase (TH) (pour détecter les neurones dopaminergiques dans la substance noire et leur innervation dans le striatum).

Analyse quantitative

- Le nombre de neurones dopaminergiques (TH positifs), dans la substance noire est le paramètre d'évaluation des effets de l'adénovirus Ad-BDNF. Le
15 dénombrement est réalisé sur un échantillon (1 coupe sur 6 sur toute la longueur de la substance noire). Pour chaque coupe, les neurones TH positifs sont dénombrés séparément des 2 cotés de la substance noire. Les résultats cumulés pour toutes les coupes sont exprimés en proportion : nombre de neurones TH positifs du côté lésé par rapport au nombre de neurones TH positifs du côté non lésé.

20 Analyse comportementale

- Afin d'évaluer les effets fonctionnels protecteurs d'une injection d'adénovirus Ad-BDNF sur la lésion de la voie nigro-striée, les performances sensori-motrices des animaux sont analysées au cours de 2 tests comportementaux : le test de la rotation induite par des agonistes dopaminergiques (apomorphine, amphétamine et lévodopa),
25 et le test de préhension ("paw-reaching").

Exemple 8 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion de la voie perforante

- Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion de la voie
30 perforante, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

5 Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie entorhino-hippocampique (voie perforante) a été sectionnée unilatéralement à l'aide d'un couteau chirurgical. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées à cet effet sont, par rapport au lambda : AP : +0,75; ML : +4,1 à 6,6; V : -7,7 (coordonnée V déterminée par rapport à la dure-mère).

10 L'adénovirus recombinant BDNF est injecté immédiatement après la lésion, soit au niveau de la lésion, soit au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal. Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

15 Les injections ont été réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans l'hippocampe, le cortex entorhinal et le site de lésion de la voie perforante sont respectivement 3 μ l, 2 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

20 Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention peuvent être mis en évidence par une analyse comportementale dans les conditions de l'exemple 6.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.

(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON

(C) VILLE: ANTONY

10

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Virus recombinants, préparation et utilisation en thérapie génique

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

20

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

30

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TTCATCGAAT TCCACCAGGT GAGAAG

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

40

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

45

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AATATAATCT AGACAACATA AATCC

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

55

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

60

22

(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(iii) HYPOTHETIQUE: NON
5 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TAGCTTCATC GATTCCACC AG

22

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 25 paires de bases
15 (B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
20 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

AATATAATCT AGACAACATA AATCC

25

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
30 (B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

40 AGA GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC TAG
Arg Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp ***
1 5

30

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou un dérivé de celui-ci.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le prépro-BDNF.
3. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
4. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le prépro-BDNF humain.
6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses.
7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
8. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le prépro-BDNF humain sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
9. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le prépro-BDNF humain sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
10. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules nerveuses.
11. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 10 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur de l'énolase neurone spécifique et le promoteur de la GFAP.

12. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.

14. Adénovirus selon la revendication 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.

15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

16. Utilisation selon la revendication 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington ou de l'ALS.

17. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 ou 18 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

20. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

21. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

22. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule gliale ou kératynocyte.

23. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 20 à 22 et une matrice extracellulaire.

24. Implant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.

25. Implant selon les revendications 23 ou 24 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.

26. Implant selon la revendication 25 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

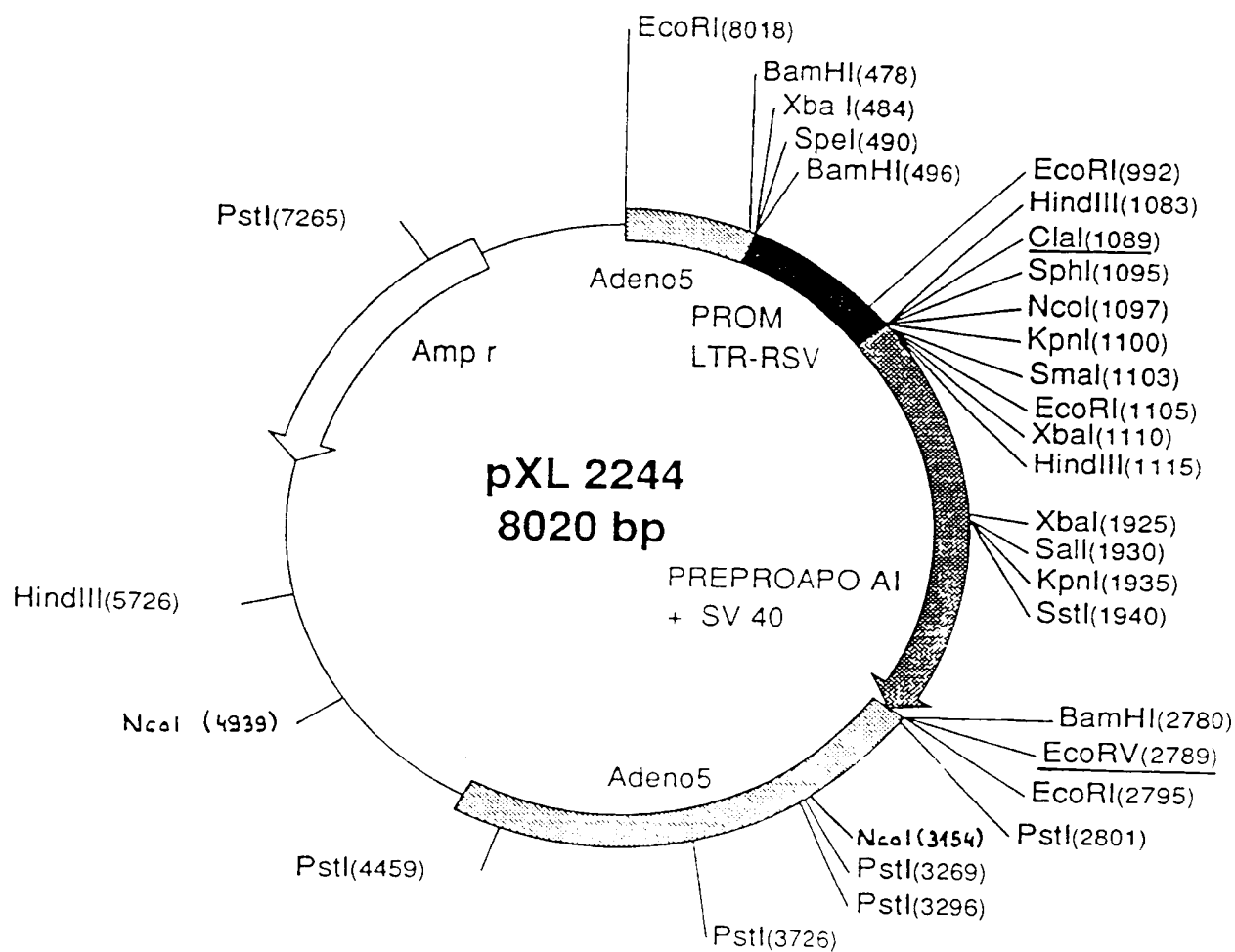


Figure 1

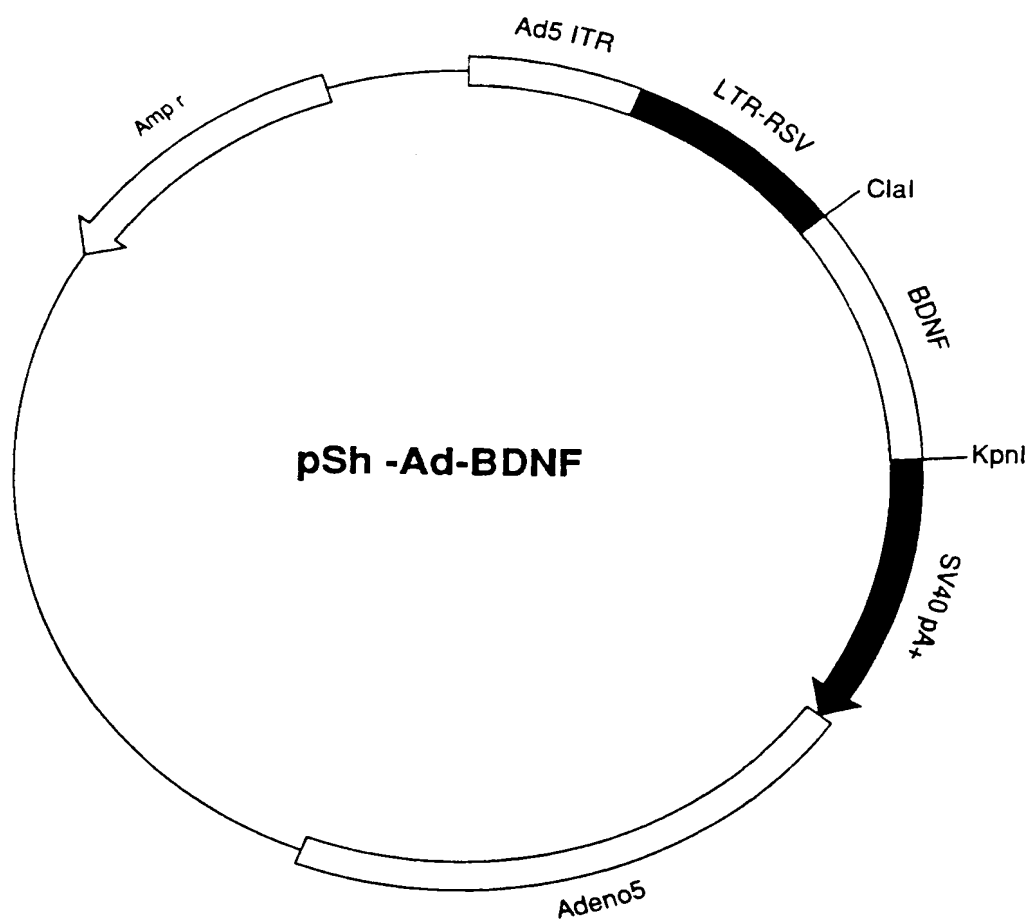


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/FR 95/00250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C07K14/475 C12N7/01
C12N5/10 A61K39/235

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCIENCE, vol.259, 12 February 1993, LANCASTER, PA US pages 988 - 990 LE GAL LA SALLE, G. ET AL. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' see the whole document --- -/--	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 May 1995

Date of mailing of the international search report

09.06.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/FR 95/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' see the whole document	1-26
O,Y	& XIIth congrès de la société française d'hématologie, Strasbourg, France 1er au 3 Juin 1993 ---	1-26
P,Y	NEUROREPORT, vol.5, no.7, 21 March 1994 pages 801 - 804 RIDOUX, V. ET AL. 'The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells' see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,94 03199 (REGENERON PHARM. INC.) 17 February 1994 see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,93 08828 (GENERAL HOSPITAL CORP. & SYNTEX-SYNERGEN NEUROSCIENCE JOINT VENTURE) 13 May 1993 see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,93 01300 (MAX PLANCK GES. FÖRDERUNG WIISE & REGENERON PHARM INC.) 21 January 1993 see the whole document ---	1-26
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 September 1993 see claims ---	1-26
P,Y	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 April 1994 see the whole document ---	1-26
A	MEDECINE /SCIENCES, vol.9, no.2, February 1993 pages 208 - 210 DANOS, O. ET AL. 'Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' see the whole document ---	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 1 Application No
PCT/FR 95/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.208, no.2, September 1992, AMSTERDAM NL pages 211 - 225 ROEMER, K. & FRIEDMANN, T. 'Concepts and strategies for human gene therapy' see page 218, column 2, paragraph 3 - page 219, column 1, paragraph 1 ---	1
T	WO,A,94 24297 (RHONE-POULENC RORER S.A. ET AL.) 27 October 1994 see the whole document ---	1
A	BRAIN RESEARCH, vol.648, no.1, 1994 pages 171 - 175 RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' see the whole document ---	1
A	SCIENCE, vol.256, no.5063, 12 June 1992, LANCASTER, PA US pages 1550 - 1552 CULVER, K. W. ET AL. 'In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors' see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No
PCT/FR 95/00250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9403199	17-02-94	AU-B- 4995193	03-03-94
WO-A-9308828	13-05-93	AU-A- 3129793	07-06-93
WO-A-9301300	21-01-93	AU-A- 2009592	11-02-93
		CA-A- 2113083	11-01-93
		EP-A- 0593516	27-04-94
		FI-A- 940098	10-03-94
		JP-T- 6509094	13-10-94
		NO-A- 940083	18-02-94
		NO-A- 940084	08-03-94
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		WO-A- 9319191	30-09-93
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
WO-A-9408026	14-04-94	AU-B- 4818093	26-04-94
		NO-A- 951121	23-03-95
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A- 2704234	28-10-94
		AU-B- 6572194	08-11-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00250

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C07K14/475 C12N7/01 C12N5/10 A61K39/235		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A61K C07K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SCIENCE, vol.259, 12 Février 1993, LANCASTER, PA US pages 988 - 990 LE GAL LA SALLE, G. ET AL. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' voir le document en entier <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-26
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">29 Mai 1995</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">- 9. 06. 95</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">Chambonnet, F</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No
 PCT/FR 95/00250

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' voir le document en entier	1-26
O,Y	& XIIth congrès de la société française d'hématologie, Strasbourg, France 1er au 3 Juin 1993 ---	1-26
P,Y	NEUROREPORT, vol.5, no.7, 21 Mars 1994 pages 801 - 804 RIDOUX, V. ET AL. 'The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells' voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,94 03199 (REGENERON PHARM. INC.) 17 Février 1994 voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,93 08828 (GENERAL HOSPITAL CORP. & SYNTEX-SYNERGEN NEUROSCIENCE JOINT VENTURE) 13 Mai 1993 voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,93 01300 (MAX PLANCK GES. FÖRDERUNG WIISE & REGENERON PHARM INC.) 21 Janvier 1993 voir le document en entier ---	1-26
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 Septembre 1993 voir revendications ---	1-26
P,Y	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 Avril 1994 voir le document en entier ---	1-26
A	MEDECINE /SCIENCES, vol.9, no.2, Février 1993 pages 208 - 210 DANOS, O. ET AL. 'Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' voir le document en entier ---	1
	--- -/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00250

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.208, no.2, Septembre 1992, AMSTERDAM NL pages 211 - 225 ROEMER, K. & FRIEDMANN, T. 'Concepts and strategies for human gene therapy' voir page 218, colonne 2, alinéa 3 - page 219, colonne 1, alinéa 1 ---</p>	1
T	<p>WO,A,94 24297 (RHONE-POULENC RORER S.A. ET AL.) 27 Octobre 1994 voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>BRAIN RESEARCH, vol.648, no.1, 1994 pages 171 - 175 RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>SCIENCE, vol.256, no.5063, 12 Juin 1992, LANCASTER, PA US pages 1550 - 1552 CULVER, K. W. ET AL. 'In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors' voir le document en entier -----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demar ternaionale No

PCT/FR 95/00250

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9403199	17-02-94	AU-B- 4995193	03-03-94
WO-A-9308828	13-05-93	AU-A- 3129793	07-06-93
WO-A-9301300	21-01-93	AU-A- 2009592	11-02-93
		CA-A- 2113083	11-01-93
		EP-A- 0593516	27-04-94
		FI-A- 940098	10-03-94
		JP-T- 6509094	13-10-94
		NO-A- 940083	18-02-94
		NO-A- 940084	08-03-94
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		WO-A- 9319191	30-09-93
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
WO-A-9408026	14-04-94	AU-B- 4818093	26-04-94
		NO-A- 951121	23-03-95
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A- 2704234	28-10-94
		AU-B- 6572194	08-11-94

